

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP2004/000160

JP04/160

13. 1. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 7月14日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-196459
[ST. 10/C]: [JP2003-196459]

REC'D 27 FEB 2004

WIPO

PCT

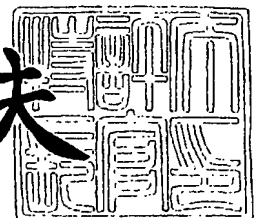
出 願 人
Applicant(s): 小杉 好紀
黒田 雅彦

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3009043

【書類名】 特許願

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【整理番号】 NP03217-YS

【提出日】 平成15年 7月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 16/18
G01N 33/53

【発明の名称】 子宮内膜症関連疾患の診断方法

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 東京都杉並区浜田山 4 - 2 7 - 4
ウエストコート 2 0 5

【氏名】 黒田 雅彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区新宿 5 - 4 - 2 4 - 3 0 2

【氏名】 及川 恒輔

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区羽根木 1 - 3 - 2

【氏名】 小杉 好紀

【発明者】

【住所又は居所】 東京都葛飾区亀有 4 - 3 4 - 8 - 3 0 2

【氏名】 大林 徹也

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都世田谷区羽根木 1 - 3 - 2

【氏名又は名称】 小杉 好紀

【特許出願人】

【識別番号】 503028352

【氏名又は名称】 黒田 雅彦

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 子宮内膜症関連疾患の診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子（HRFタンパク質）の存在量を測定し、HRFタンパク質量を正常生体試料のそれと比較し、正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質量を示す被験者を、子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

【請求項 2】 HRFタンパク質を認識する抗体。

【請求項 3】 請求項 2 の抗体とは異なるエピトープと結合する抗体。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の90～130位から選択された連続した5～20個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた請求項 2 または 3 の抗体。

【請求項 5】 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の1～95位から選択された連続した5～20個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた請求項 2 または 3 の抗体。

【請求項 6】 配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列の115～172位から選択された連続した5～20個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた請求項 2 または 3 の抗体。

【請求項 7】 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を請求項 2 の抗体を固定化した担体と接触する工程；
- (b) 工程(a)で生体試料と接触させた担体を洗浄する工程；
- (c) 工程(b)で洗浄した担体に標識化した請求項 3 の抗体を接触させる工程；
- (d) 担体上の結合標識あるいは遊離標識を測定する工程；
- (e) 工程(d)で測定された標識量をHRFタンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (f) 正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

【請求項 8】 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を組織固定化処理に付す工程；
- (b) 工程(a)で調製された組織固定化標本を切片とする工程；
- (c) 工程(b)で得られた切片化組織を請求項 2 の抗体による免疫組織染色に付す工程；
- (d) 工程(c)による免疫組織染色の程度をHRFタンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (e) 正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質存在量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。

【請求項 9】 少なくとも標識化した請求項 2 の抗体を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患診断キット。

【請求項 10】 少なくとも以下の要素：

- (a) 請求項 2 の抗体；および
 - (b) 標識化した請求項 3 の抗体
- を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患診断キット。

【請求項 11】 少なくとも以下の要素：

- (a) 請求項 2 の抗体を固定化した担体；および
 - (b) 標識化した請求項 3 の抗体
- を含むことを特徴とする子宮内膜症診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、子宮内膜症関連疾患の分子生物学的な診断方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】

子宮内膜症は一般的な産婦人科疾患であり、生殖可能年齢にある全女性の10%に影響している（非特許文献1）。子宮内膜症の組織は正所性子宮内膜のように

周期的な増殖と崩壊を経て、周期的月経困難症、性交疼痛症、骨盤痛、および月経時血尿の原因になる。さらに不妊症患者の30～40%がこの疾患を有していることも報告されている（非特許文献2）。一部の患者で子宮内膜細胞が転移し、異所的に増殖する際のメカニズムは未だに不明であるが、炎症性サイトカインの脱調節化が子宮内膜症の進行に寄与している可能性がある（非特許文献3、4）。事実、単球の活性化と腹腔内への移動が、子宮内膜症において最も一貫して報告されている免疫学的異常性の一つとなっている（非特許文献5～8）。

【0003】

ダイオキシンは内分泌攪乱物質の一種であり、環境中に遍在している。3,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD; ダイオキシン) はダイオキシン群の中でも最も毒性が高い物質であり、各種の毒性効果（例えば、免疫毒性、血液毒性、催奇形性、および発ガン性など）を有している（非特許文献9、10）。TCDD および関連化合物が誘導する遺伝子発現の変化は、毒素がアリル炭化水素受容体 (AhR) に結合した時点で開始され、次にアリル炭化水素受容体核トランスロケーター (ARNT) と二量体を形成して、XRE (異物応答配列) モチーフを含む遺伝子調節要素と相互作用する複合体を形成する（非特許文献11、12）。サルをTCDDに慢性曝露させると、用量依存的に軽度から重度の子宮内膜症が発現したことから（非特許文献13）、ダイオキシンと子宮内膜症の関連性について幾つかの研究が行われた（非特許文献14～18）。しかしながらTCDD曝露は子宮内膜症に相関しないと言う結果が最近報告され（非特許文献19、20）、ダイオキシン曝露と子宮内膜症の関連性は不明のままとなっている。

【0004】

なおこの出願の発明者らは、IgE依存性ヒスタミン放出因子 (Histamine Releasing Factor: HRF) を含むTCDD標的遺伝子を同定している（非特許文献21～23）。しかしながら、このようなTCDD標的遺伝子産物としてのHRFと子宮内膜症との関係は一切知られていない。

【0005】

【非特許文献1】

Wheeler J.M. J. Reprod Med. 1989, 34(1):41-6

【非特許文献2】

Candiani G.B. et al. Obstet Gynecol. Surv. 1991, 46(6):374-82

【非特許文献3】

Garcia-Velasco J.A. and Arici A. Fertil Steril. 1999, 71(6):983-93

【非特許文献4】

Barcz et al. Med. Sci. Monit. 2000, 6(5):1042-6

【非特許文献5】

Jolicoeur C. et al. Am. J. Pathol. 1998, 152(1):125-33

【非特許文献6】

Lebovic D.I. et al. Fertil Steril 2001, 75(1):1-10

【非特許文献7】

Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158(6):1949-54

【非特許文献8】

Blumenthal R.D. et al. Am. J. Pathol. 2000, 156(5):1581-8

【非特許文献9】

Chapman D.E. and Schiller C.M. Toxicol Appl. Pharmacol. 1985, 78(1):
147-57

【非特許文献10】

McGregor D.B. et al. Environ Health Perspect. 1998, 106 Suppl 2:755-
60

【非特許文献11】

Sagawa K. and Fujii-Kuriyama T. J. Biochem. (Tokyo) 1997, 122(6):107
5-9

【非特許文献12】

Nebert D.W. Crit. Rev. Toxicol. 1989, 20(3):153-74

【非特許文献13】

Rier S.E. et al. Fundam. Appl. Toxicol. 1993, 21(4):433-41

【非特許文献14】

Gibbons A. Science 1993, 262(5183):1373

【非特許文献15】

Obsteen K.G. and Sierra-Rivera E. Endocrinol. 1997, 15(3):301-8

【非特許文献16】

Bruner-Tran K.L. et al. Gynecol. Obstet. Invest. 1999, 48 Suppl. 1:4
5-56

【非特許文献17】

Johson K.L. et al. Environ Health Perspect 1997, 105(7):750-5

【非特許文献18】

Yang J.Z. and Foster W.G. Toxicol. Ind. Health 1997, 13(1):15-25

【非特許文献19】

Igarashi T. et al. Endocr. J. 1999, 46(6):765-72

【非特許文献20】

Pauwels A. et al. Hum. Reprod. 2001, 16(10):2050-5

【非特許文献21】

Oikawa K. et al. Cancer Res. 2001, 61(15):5707-9

【非特許文献22】

Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7

【非特許文献23】

Ohbayashi et al. FEBS Lett. 2001, 508(3):341-4

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】

子宮内膜症の診断は、従来は、腹腔内視鏡による観血的な方法以外には有効な方法は存在しなかった。

【0 0 0 7】

一方、各種のヒト疾患に対して、その疾患に特異的なマーカータンパク質やその遺伝子発現を指標とする分子生物学的診断が普及しつつある。この方法は、大がかりな設備を必要とせず、被験者への負担も少ないため、自覚症状のない多くの被験者に対しても広範囲に実施することが可能である。しかしながら、子宮内膜症については、このような分子生物学的な診断方法を行うための有効なマーカー

ータンパク質やその遺伝子は知られていない。

【0008】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、子宮内膜症に密接に関連するマーカータンパク質を利用しい分子生物学的な診断方法を提供することを課題としている。

【0009】

またこの出願の発明は、この診断方法に使用する各種材料を提供することを課題としている。

【0010】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(8)の発明を提供する。

- (1) 被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子（HRFタンパク質）の存在量を測定し、HRFタンパク質量を正常生体試料のそれと比較し、正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質量を示す被験者を、子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定することを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。
- (2) HRFタンパク質を認識する抗体。
- (3) 前記発明(2)の抗体とは異なるエピトープと結合する抗体。
- (4) 配列表の配列番号2のアミノ酸配列の90～130位から選択された連続した5～20個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた前記発明(2)または(3)の抗体。
- (5) 配列表の配列番号2のアミノ酸配列の1～95位から選択された連続した5～20個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた前記発明(2)または(3)の抗体。
- (6) 配列表の配列番号2のアミノ酸配列の115～172位から選択された連続した5～20個のアミノ酸残基を有するペプチドを免疫抗原として得られた前記発明(2)または(3)の抗体。
- (7) 少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を前記発明(2)の抗体を固定化した担体と接触する工程；
 - (b) 工程(a)で生体試料と接触させた担体を洗浄する工程；
 - (c) 工程(b)で洗浄した担体に標識化した前記発明(3)の抗体を接触させる工程；
 - (d) 担体上の結合標識あるいは遊離標識を測定する工程；
 - (e) 工程(d)で測定された標識量をHRFタンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
 - (f) 正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。
- (8) 少なくとも以下の工程：
- (a) 被験者の生体試料を組織固定化処理に付す工程；
 - (b) 工程(a)で調製された組織固定化標本を切片とする工程；
 - (c) 工程(b)で得られた切片化組織を前記発明(2)の抗体による免疫組織染色に付す工程；
 - (d) 工程(c)による免疫組織染色の程度をHRFタンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
 - (e) 正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質存在量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法。
- (9) 少なくとも標識化した前記発明(2)の抗体を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患診断キット。
- (10) 少なくとも以下の要素：
- (a) 前記発明(2)の抗体；および
 - (b) 標識化した前記発明(3)の抗体
- を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患診断キット。
- (11) 少なくとも以下の要素：
- (a) 前記発明(2)の抗体を固定化した担体；および
 - (b) 標識化した前記発明(3)の抗体

を含むことを特徴とする子宮内膜症診断キット。

【0011】

すなわち、この出願の発明者らは、子宮内膜組織と子宮内膜症移植片における TCDD 標的遺伝子 (HRF、CYP1A1) の発現を調べた結果、子宮内膜症の進行と HRF 発現レベルに高い相関関係を見出してこの出願の発明を完成させた。

【0012】

なおこの発明において、「子宮内膜症関連疾患」とは、子宮内膜症、および子宮内膜症を原因とする月経困難症、不妊症および子宮腺筋症等を意味する。「診断」とは、被験者が子宮内膜症関連疾患に罹患しているか否かの判定、将来的に子宮内膜症関連疾患に罹患する危険性が存在するか否かの判定、および治療後に子宮内膜症関連疾患を再発する危険性が存在するか否かの判定を意味する。また、診断には、子宮内膜症関連疾患の罹患やその危険性がどの程度であるか測定することも含まれる。

【0013】

なおこの発明において、「HRF ポリヌクレオチド」とは HRF タンパク質をコードするポリヌクレオチド [プリンまたはピリミジンが糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (ATP、GTP、CTP、UTP; または dATP、dGTP、dCTP、dTTP) が結合した分子を意味する。具体的には、HRF タンパク質をコードするゲノム DNA、ゲノム DNA から転写される mRNA、mRNA から合成される cDNA である。また、2本鎖であっても1本鎖であってもよい。さらに、これらのゲノム DNA や mRNA、cDNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖も含まれる。また「ポリヌクレオチド」とは、前記のヌクレオチドが100個以上結合した分子を言い、「オリゴヌクレオチド」とは2-99個連結した分子を言う。さらに「タンパク質」および「ペプチド」とは、アミド結合 (ペプチド結合) によって互いに結合した複数個のアミノ酸残基から構成された分子を意味する。特にアミノ酸残基2-33個のものを「オリゴペプチド」、34個以上のものを「ポリペプチド」と記載する。

【0014】

また、配列表に示した塩基配列およびアミノ酸配列については、1以上の塩基の付加、欠失、他の塩基への置換、あるいはこれらの塩基変異に基づく1以上の

アミノ酸残基の付加、欠失および他のアミノ酸への置換をも包含する。

【0015】

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。なお、用語は基本的にはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるものであり、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術はJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995; 日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、東京化学同人(1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸 III (組換えDNA 技術)」、東京化学同人(1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 306, Academic Press, New York (1999)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる(それらの中にある記載はそれを

参照することにより本明細書の開示に含まれる)。

【0016】

以下、各発明について、実施形態を詳しく説明する。

【0017】

【発明の実施の形態】

この出願の発明(1)の診断方法は、被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子(HRFタンパク質)の存在量を測定し、このHRFタンパク質を指標として子宮内膜症関連疾患を診断する方法である。すなわち、HRFタンパク質量が正常生体試料と比較して有意に多い被験者を子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定する。すなわち、HRFタンパク質の存在量が有意に多い被験者を子宮内膜症関連疾患の患者またはそのハイリスク者と判定する。HRF遺伝子から発現するHRFタンパク質の存在量は子宮内膜症関連疾患と密接に関連することから、被験者の生体試料(例えば子宮内膜組織等)におけるこのHRFタンパク質量を指標として子宮内膜症の診断を行うことができる。またHRタンパク質量が「有意に多い」とは、被験者のHRFタンパク質量が正常生体試料(すなわち健常者の生体試料)において測定されたHRFタンパク質量と比較して、10%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは100%以上である場合を意味する。またさらに、この「有意に多い」とは、例えば同一被験者の複数試料についてのHRFポリヌクレオチド発現量の平均値と、複数の正常試料における同様の平均値とを統計的に検定した場合、前者が後者よりも有意に多い場合である。

【0018】

以上のとおりのHRFタンパク質量を指標とする発明(1)の診断方法は、公知の遺伝子工学および分子生物学的技術に従い、当該分野で特定のタンパク質量を検知測定するために知られた手法、例えばin situ ハイブリダイゼーション、ウェスタンブロッティング、各種の免疫組織学的方法などによってHRFタンパク質量を検知・測定して実施することができる。こうした技術を利用したHRFタンパク質量測定系、子宮内膜症関連疾患の検出系、子宮内膜症関連疾患のリスク検出系、それに利用する試薬、方法、プロセス、解析プログラムなどは、すべてこの発明

の技術およびそれに利用するシステムに含まれる。

【0019】

この出願は、前記の発明(1)の診断方法に使用する材料として、特に以下の発明(2)および(3)の抗体を提供する。

【0020】

発明(2)の抗体は、HRFタンパク質を特異的に認識する抗体(抗HRF抗体)である。なおここで言う「抗体」とは、広義の意味で使用されるものであってよく、所望のHRFポリペプチドおよび関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体組成物であってよく、また1価抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型(intact)分子並びにそれらのフラグメントおよび誘導体も表すものであり、F(ab')₂、Fab'およびFabといったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ(epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、または、例えば、クワドローム(quadrome)、トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えられるもの、公知の細胞融合またはハイブリドーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書で記載し且つ定義する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体または結合特性を有する抗体を包含してよい。特に好ましい抗体は、天然型のHRFタンパク質量(ポリペプチド)を特異的に識別できるものであり、例えば、前記発明(4)～(6)の抗体等である。

【0021】

すなわち、発明(4)～(6)の抗体はそれぞれ配列番号2のアミノ酸配列からなるHRFタンパク質の部分ペプチドを抗原として調製された抗体であり、それぞれHRFタンパク質の異なる部位を認識する抗体である。このような抗体作成のためのHRFペプチドは、例えばペプチド合成機を使用して、例えばFmoc-bop法で合成する。HRFペプチドのN末端にはシステインを導入してもよい。合成したペプチドはμ

Bondasphere、C18カラム (Waters) などを用いた高速液体クロマトグラフィーなどにより精製して免疫抗原として使用する。

【0022】

発明(3)の抗体は、前記発明(2)の抗体とは異なるエピトープに結合する抗体である。このような抗体は、前記発明(2)の抗体作製のためのオリゴペプチドとは異なる断片を免疫原とすることによって、前記と同様のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として作製される。例えば、前記発明(4)～(6)の抗体は、いずれかが発明(2)の抗体となり、他が発明(3)の抗体となる。

【0023】

このような抗体は、例えばポリクローナル抗体の場合には、HRFタンパク質やその一部断片 (オリゴペプチド) を免疫原として動物を免疫した後、血清から得ることができる。あるいは、HRFタンパク質ポリヌクレオチドの組換えベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる。動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、サル、ニワトリなどが用いられる。さらには、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい場合もある。

【0024】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座 14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座 12、分子免疫学 III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物などの腹腔内または皮下に注射することにより行われる。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。免疫化剤を (必要に応じアジバントと共に) 一回又はそれ以上の回数哺乳動物に注射することにより免疫化される。代表的には、該免疫化剤及び/又はアジバントを哺乳動物に複数回皮下注射あるいは腹腔内注射することによりなされる。免疫化剤は、上記抗原ペプチドあるいはその関連ペプチド断片を含むものが挙げられる。

。免疫化剤は、免疫処理される哺乳動物において免疫原性であることの知られているタンパク質（例えば上記担体タンパク質類など）とコンジュゲートを形成せしめて使用してもよい。アジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リピッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。

【0025】

ポリクローナル抗体を含む抗血清は、免疫された動物を所定の期間飼育した後、当該動物から採血した血液から調製することができる。得られた抗血清は、HRFを認識するものであることを確認した後、本発明所定の活性成分として供される。

【0026】

この発明において、抗HRF抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体として得られたものを使用することもできる。抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて産生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が産生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なった抗原決定基（エピトープ）に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の（ポリクローナル）抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他の免疫グロブリン類の夾雑がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビナント抗体を含むものである。それらは、所望の生物活性を示す限り、その由来や免疫グロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり、あ

るいは軽鎖を重鎖で置き換えたり、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることができる（例えば、米国特許第4816567号；Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 など）。

【0027】

また、モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作製法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い作製することができる。

【0028】

このような抗体作製のためのHRFタンパク質またはHRFペプチドは、例えば、HRFポリヌクレオチドを保有する組換え発現ベクターを用いた公知のインビトロ転写・翻訳法や、適当な宿主（大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、動植物細胞等）-ベクター系を用いた遺伝子組換え技術によって取得することができる。例えば、配列表配列番号1のHRF遺伝子／アミノ酸配列に基づき、HRFあるいはその一部のドメイン、HRFの一部のタンパク質あるいはポリペプチドフラグメント、HRFのアミノ酸配列に相当する一部のアミノ酸配列を持つペプチドをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のHRFタンパク質あるいはその一部のドメインタンパク質、HRFの一部のタンパク質あるいはポリペプチドフラグメント、HRFのアミノ酸配列に相当する一部のアミノ酸配列を持つペプチドを公知の方法で精製する。また特にオリゴペプチドは、固相等の公知の方法により化学的に合成することもできる。

【0029】

なお、HRFポリヌクレオチドは各種の変異体（例えば、GenBank/XM_294045、XM_038391、XM_293291、XM_209741、XM_210566、XM_066706、XM_066675、XM_071321等）が知られているが、SEQ ID:1（塩基配列）に示したHRF cDNA（またはTPT-1：GenBank/NM_003295）を好ましいものとして例示する。このようなポリヌクレ

オチドは、それぞれ公知の方法によって容易に取得することができる。例えば、cDNAの場合には、公知の方法 (Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982; J. Gene 25, 263-269, 1983; Gene, 150, 243-250, 1994) を用いてcDNAを合成し、それぞれ公知の塩基塩基配列に基づいて作製したプローブDNAを用いて、それぞれのcDNAを単離する方法によって取得することができる。得られたcDNAは、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法およびSDA (Strand Displacement Amplification) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅することができる。また、この発明によって提供されるプライマーセットを用い、ヒト細胞から単離したmRNAを鋳型とするRT-PCR法によっても必要量の各cDNAを得ることができる。

【0030】

また、特定のHRFペプチドをコードするHRFオリゴヌクレオチドは、例えば前記のポリヌクレオチド(cDNA)を適当な制限酵素で切断することによって得ることができる。あるいは、Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acid Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4,458,066号に記載されているような周知の化学合成技術により、in vitroにおいて合成することができる。

【0031】

発明(2)および(3)の抗体は必要に応じてそれをより精製された形態のものとして使用される。抗体を精製・単離する手法としては、従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して用いることができる。好ましくは、抗血清、モノクローナル抗体を含有する腹水などは、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテ

イン A カラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など）を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテイン A を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0032】

これら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られる Fab、Fab'、F(ab')₂ といった抗体フラグメントにして使用してもよい。抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

【0033】

抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当分野で知られる任意の方法を使用することができ、例えば、David et al., Biochemistry, 13 巻, 1014-1021 頁 (1974); Pain et al, J. Immunol. Meth., 40: pp.219-231 (1981); 及び "Methods in Enzymology", Vol. 184, pp.138-163 (1990) により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG 画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部 Fab' を用いることができる。

【0034】

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、この発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、この発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えばアミノアルキルシリルガラスなどの活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカーアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリカーボネート、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド

、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、シリコンガムなど、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。

【0035】

担体としては、粒子、微粒子、マイクロパーティクル、メンブレン、ろ紙、ビーズ、チューブ、キュベット、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、マイクロプレート、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。

【0036】

これら担体へ抗HRF抗体との結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。

【0037】

発明(2)および(3)の抗体には、それぞれ標識物質によって標識化された抗体も含まれる。標識としては、酵素、酵素基質、酵素阻害物質、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、非金属元素粒子、例えばセレンコロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。好ましい標識物質は、酵素、放射性同位体または蛍光色素をふくむ化学物質を使用することができる。酵素は、turnover numberが大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常のEIAに用いられる酵素を使用できる。酵素としては、脱水

素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。酵素標識などは、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。このように、ビオチン-アビジン系を使用したり、抗HRF抗体に対する抗体などの二次的な抗体を使用するなど、当該分野で公知の感度増強法を適宜採用することができる。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

【0038】

代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 β -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリフォスファターゼなどが挙げられる。

【0039】

これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができ、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体などが挙げられ、例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、o-フェニレンジアミン(OPD)、テトラメチルベンジジン(TMB)、5-アミノサリチル酸、3,3'-ジアミノ

ベンジジンテトラヒドロクロライド(DAB)、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)、チラミン、ルミノール、ルシゲニンルシフェリン及びその誘導体、Pholad luciferinなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、ルミジェンPPD、(4-メチル)ウンベリフェリル-リン酸、p-ニトロフェノール-リン酸、フェノール-リン酸、プロモクロロインドリルリン酸(BCIP)、AMPAK™(DAKO)、AmpliQ™(DAKO)などとアルカリフォスファターゼ、4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシドといったウンベリフェリルガラクトシド、o-ニトロフェノール-β-D-ガラクトシドといったニトロフェニルガラクトシドなどとβ-D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼ、ABTSなどとグルコースオキシダーゼなどの酵素試薬の組み合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リボ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

【0040】

放射性同位体としては、³²P、¹²⁵I、¹⁴C、³⁵S、³H等の通常のRIAで用いられているものを使用することができる。蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(RITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネートアイソマーR(TRITC)などのローダミン誘導体、7-アミノ-4-クマリン-3-酢酸、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。蛍光色素としては、通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。発色、蛍光などを含めた生成する信号などを検知するには、視覚によることもできるが、公知の装置を使用することもでき、例えば蛍光光度計、プレートリーダーなども使用できる。また、放射性同位体(アイソトープ)などの出す信号を検知するには、公知の装置を使用することもでき、例えばガンマーカウンター、シンチレーションなども使用することができる。

【0041】

抗体を標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。縮合剤としては、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ϵ -マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

【0042】

このような抗体を用いた診断方法における一つの態様は、抗体とHRFタンパク質との結合を液相系において検出する方法である。例えば、発明(2)の抗体を標識化した標識化抗体と生体試料とを接触させて標識化抗体とHRFタンパク質を結合させ、この結合体を分離する。分離は、HRFタンパク質+標識化抗体の結合体を公知の分離手段(クロマト法、固相等)によって分離する方法等によって行うことができる。また公知のウエスタンブロット法に準じた方法を採用することもできる。標識シグナルの測定は、標識として酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することに

よって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンター等により測定する。また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

【 0 0 4 3 】

液相系での診断の別の方法は、発明(2)の抗体（一次抗体）と生体試料とを接触させて一次抗体とHRFタンパク質を結合させ、この結合体に標識化した発明(2)の抗体（二次抗体）を結合させ、この三者の結合体における標識シグナルを検出する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず抗体+抗原ペプチド結合体に結合させ、この二次抗体に標識物質を結合させるようにしてもよい。このような二次抗体への標識物質の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、標識物質をアビジン化しておくことによって行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域（例えば、Fc領域）を認識する抗体（三次抗体）を標識し、この三次抗体を二次抗体に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。液相からの結合体の分離やシグナルの検出は前記と同様とすることができる。また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、発明(10)の診断キットが提供される。

【 0 0 4 4 】

抗体を用いた別の診断法は、抗体とHRFタンパク質との結合を固相系において試験する方法である。この固相系における方法は、極微量のHRFタンパク質の検出と操作の簡便化のため好ましい方法である。すなわちこの固相系の方法は、発明(2)の抗体を樹脂プレートまたはメンブレン等に固定化し、この固定化抗体にHRFタンパク質を結合させ、非結合タンパク質を洗浄除去した後、プレート上に残った抗体+HRFタンパク質結合体に発明(3)の抗体を標識化した標識化抗体を結合させて、この標識化抗体のシグナルを検出する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)」として広く用いられて

いる方法である。2週類の抗体は、両方ともモノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、いずれか一方をポリクローナル抗体とすることもできる。

【0045】

この発明での診断はまた、免疫染色、例えば組織あるいは細胞染色、免疫電子顕微鏡、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、放射免疫測定法(RIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、ルミネッセント免疫測定法(LIA)、酵素免疫測定法(EIA)、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくはRIA、EIA、FIA、LIAであり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。サンドイッチ型アッセイには、同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどが包含されてよい。

【0046】

この出願の発明におけるHRFタンパク質量の測定系としては、例えば組織に対しては免疫染色、免疫電子顕微鏡などの蛋白測定系、組織抽出物、血液、体液等に対してはEIA、RIA、FIA、LIA、ウエスタンブロッティングなどの蛋白測定系。

【0047】

EIAの測定系において、例えば競合法では、抗HRF抗体を固相化抗体として使用し、標識抗原及び非標識抗原（抗原としては、HRFタンパク質あるいはそのフラグメントペプチドなどが挙げられる）を使用し、また非競合法で、例えばサンドイッチ法では、固相化抗HRF抗体や標識抗HRF抗体を利用できる他、抗HRF抗体を直接標識したり、固相化せずに、抗HRF抗体に対する抗体を標識したり、固相化して行うこともできる。感度増幅法としては、例えば、非酵素標識一次抗体との組み合わせでは、高分子ポリマーと酵素と一次抗体を利用するもの（Envision試薬を応用したもの；Enhanced polymer one-step staining (EPOS))が挙げられ、非酵素標識二次抗体との組み合わせでは、例えばPAP(peroxidase-antiperoxidase)法などの酵素と抗酵素抗体複合体の組合せ、SABC(avidin-biotinylated peroxidase complex)法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素-アビジン複合体の組合せ、ABC(streptavidin-biotin complex)法、LSAB(labeled streptavidin-

biotin)法などのビオチン標識二次抗体とビオチン標識酵素ーストレプトアビジン複合体の組合せ、CSA(catalyzed signal amplification)法などのSABCとビオチン標識タイラミドと酵素標識ストレプトアビジンの組合せ、高分子ポリマーで二次抗体と酵素を標識してあるものなどが挙げられる。

【0048】

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川 栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川 栄治ら編、「酵素免疫測定法」(第2版)、医学書院、昭和57年発行；石川 栄治ら編、「酵素免疫測定法」(第3版)、医学書院、昭和62年発行；H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Anti

gens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991)等の記載、あるいはそこで引用された文献中にある記載]。

この出願は、このような固相系において細胞抽出物や血液中のタンパク質量を測定する診断方法として発明(7)として提供する。すなわち、この発明(7)は、少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を前記発明(2)の抗体を固定化した担体と接触する工程；
- (b) 工程(a)で生体試料と接触させた担体を洗浄する工程；
- (c) 工程(b)で洗浄した担体に標識化した前記発明(3)の抗体を接触させる工程；
- (d) 担体上の結合標識あるいは遊離標識を測定する工程；
- (e) 工程(d)で測定された標識量をHRFタンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (f) 正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法である。

【0049】

また、このような診断方法の簡便かつ広範囲な実施を可能とするものとして、発明(11)の診断キットが提供される。

【0050】

さらにこの出願は、固相系において組織または細胞のHRFタンパク質量を測定する方法として、発明(8)の診断方法を提供する。すなわちこの方法は、少なくとも以下の工程：

- (a) 被験者の生体試料を組織固定化処理に付す工程；
- (b) 工程(a)で調製された組織固定化標本を切片とする工程；
- (c) 工程(b)で得られた切片化組織を前記発明(2)の抗体による免疫組織染色に付す工程；
- (d) 工程(c)による免疫組織染色の程度をHRFタンパク質量の指標とし、正常生体試料の結果と比較する工程；および
- (e) 正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質存在量を、子宮内膜症関

連疾患またはそのリスクの程度を示す指標として使用する工程、を含むことを特徴とする子宮内膜症関連疾患の診断方法である。

【0051】

この発明(8)の方法においては、抗体による免疫組織染色を1種類の抗体でおこなってもよく、あるいは2種類の抗体（例えば発明(2)の抗体と、標識化抗Ig抗体等）で行ってもよい。

【0052】

このような発明(8)等の診断を効率的に行うための手段として発明(9)の診断キットが提供される。

【0053】

発明(9)～(11)の診断キットは、前記の各診断方法を行うための試薬キットである。このようなキットは、被検成分の種類に応じて各種のものが市販されており、この発明の診断キットも、この発明によって提供される抗体および／または標識化抗体を用いることを除き、公知公用のキットに用いられている各要素によって構成することができる。

【0054】

なお、この出願によって提供される診断方法は、前記の各種方法の2以上を組み合わせて行うことができ、あるいは例えばHRFタンパク質をコードする遺伝子の発現量を公知の手段（例えばノーザンブロッティング法、RT-PCR法、DNAマイクロアレイ法等）で測定する方法と併用することもできる。

【0055】

【実施例】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例 1

1. 材料と方法

1-1. 組織試料

RNA調製のために、18例の患者から以下の試料を得た。1)子宮内膜症移植片 (n=21)、2)子宮内膜症患者に由来する正所性子宮内膜組織（掻爬による；n=4)

、3) 子宮内膜症を持たない患者に由来する正常子宮内膜組織 (n=6)。いくつかの試料は一個人の異なる部位から得た。試料は液体窒素中で凍結し、-80℃で貯蔵してRNA調製に備えた。子宮内膜症移植片は卵巣から得た。RNA調製用の正常子宮内膜組織と、正常に増殖および分泌を行う子宮内膜組織をホルマリン固定、パラフィン包埋した試料は、平滑筋腫または子宮脱の患者から取得した。病理標本は組織学的試験により段階づけを行った結果、それらは子宮内膜症の第IIIからIV段階にわたっていた (t-ASRM: revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis [改訂版米国生殖医学学会子宮内膜症分類]、1996)。また、この研究の女性被験者は子宮内膜の過形成や腫瘍形成を示さず、手術前に抗炎症剤やホルモン剤の投与を受けていなかった。手術前に書面の同意を得たが、これは東京医科大学病院の人体調査に関する施設内監査委員会により承認されたプロトコルに従った。

1-2. ノーザンブロット分析

ノーザンブロットは文献 (Oikawa K. et al. Cancer Res. 2001, 61(15):5707-9) の記載により実施した。HRFプローブは文献 (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) の記載に従って調製した。ヒト β アクチンcDNA対照プローブ (CLONTECH Laboratories, Inc.) をスタンダードとした。

1-3. サザンブロット分析を用いたRT-PCR

文献 (Kubota M. et al. Am. J. Pathol. 1997, 151(3):735-44) の記載に従い、オリゴヌクレオチドdTプライマーを用いてトータルRNAから第1鎖cDNAを合成した。次に、得られた第1鎖cDNA溶液2 μ l (1x) および10 μ l (5x) をテンプレートとして用い、PCRを行った。以下の4種類のプライマーを添加した後、初期変性を95℃で2分間、(95℃で0.5分、65℃で0.5分、72℃で1分) \times 22サイクルの条件でCYP1A1と β アクチンのcDNA断片のPCR増幅した。

【0056】

CYP1A1増幅用プライマー

5'-ccacaaccaccaagaactgcttag-3' (SEQ ID: 3)

5'-gaaggggacgaaggaagagt-3' (SEQ ID: 4)

β アクチン増幅用プライマー

5'-gggaaatcgtgcgtgacgttaag-3' (SEQ ID: 5)

5'-tgtgttggtgacgtacaggtctttg-3' (SEQ ID: 6)

増幅産物をアガロースゲル上の電気泳動により分画した後、ブロッティングとハイブリダイゼーションを行った。CYP1A1 cDNAプローブは、上述のプライマー対を用いた逆転写PCRにより得た。ヒト β アクチンcDNAプローブ (CLONTECH) を対照として用いた。Rediprime II random prime labeling system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、これらのcDNAプローブを ^{32}P により標識した。

1-4. 抗体調製と免疫組織化学法

ヒトHRFに由来するオリゴペプチド (GKLEEQRPVVKPFMT: SEQ ID: 2の101-116) に対するペプチド抗体を、ウサギを用いた標準法により行った作製し、HRF-GKLと命名した。免疫組織化学的分析は、脱パラフィン化した切片を抗HRF抗体、HRF-TPY (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) およびHRF-GKL (1:100に希釈) または抗ヒトCD68抗体 (1:100に希釈; Dako社) の混合液の存在下で一夜インキュベートした。抗HRF染色用には、脱パラフィン化した切片を圧力滅菌器を用いて熱誘導性の抗原回復に供した。LSABC (Dako) を用いて検出を行ったが、ここでは3,3'-ジアミノベンチジンを色素体として使用した。ヘマトキシリンを用いて逆染色を行った。

1-5. ウエスタンブロット分析

ウエスタンブロット分析は文献 (Oikawa K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 290(3):984-7) の記載に従って行った。膜のプローブ処理は抗HRF (HRF-GKLまたはHRF-TPY) 抗体を用い、1:2000の希釈比で行った。シグナル検出はECL plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて行った。

1-6. 細胞培養とレトロウイルス感染

NIH3T3細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC) より取得した。細胞は、37°C条件で10% FBSを添加したDMEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) 中、5%CO₂環境下に維持した。全長ORFを含むマウスHRF cDNAを以下のプライマーを用いてPCR増幅した。

【0057】

5'-ttggatccatgatcatctaccgggacctg-3' (SEQ ID: 7)

5'-ttgaattcttaacatttctccatctctaa-3' (SEQ ID: 8)

得られたcDNA断片をBamHIおよびEcoRIで消化し、レトロウイルス発現ベクターMSCV-puro (CLONTECH) のBglIII-EcoRI部位にクローニングした。組み替えレトロウイルスの調製と感染のプロトコルは文献 (Kuroda > et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(9):5025-30) の記載に従った。感染の24時間後、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ピューロマイシン (CLONTECH) を用いて2週間にわたり感染細胞を選別した。

1-7. 動物と取り扱い

5×10^5 個の細胞の部分標本を、6週齢のメスBALB/Cヌードマウスの腹腔内に注射して移植アッセイを行った。2週間後に動物を屠殺し、移植片コロニー数を測定した。

2. 結果

2-1. 子宮内膜症におけるTCDD誘導性遺伝子HRFの発現パターン

ノーザンブロット分析により、子宮内膜症時のHRF発現パターンを決定した。その結果、5例中3例の患者から得た子宮内膜症移植片組織中に高レベルのHRF発現が認められた (図1Aおよび1B)。ヒトのチトクロームp450遺伝子スーパーファミリーの一部 (例えばCYP1A1、CYP1A2およびCYP1B1) はジオキシンにより誘導されるため、CYP1A1の誘導はジオキシン依存性の遺伝子発現調節に対する基本的な標的になる。このためジオキシン曝露とHRF発現の関連を調べるために、ここではサザン分析によるRT-PCRを用いてCYP1A1発現を調査した (Trifa Y. et al. J. Biol. Chem. 1998, 273(7):3980-5; Oikawa K. et al. Gene 2000, 261(2):221-8)。その結果、CYP1A1は必ずしも高HRF発現を示す全例において誘導されている訳ではなかった (図1Aおよび1B)。このため、いくつかのケースではHRF発現がTCDDにより誘導されている可能性はあるにも関わらず、子宮内膜症移植片におけるHRFはTCDD曝露とは無関係に誘導されていることが確認された。

2-2. 子宮内膜症移植片におけるHRF過剰発現

子宮内膜症を追加発症した患者の子宮内膜症移植片において、HRFが過剰発現していることが確認された。すなわち、7例の子宮内膜症患者について、ノーザン

ンプロット分析を行った(図2A)。正常な子宮内膜組織および子宮内膜症患者の正所性の子宮内膜と比較すると、子宮内膜症移植片においては高度なHRF発現が観察された(図2B)。

2-3. 正常子宮内膜と子宮内膜症移植片におけるHRFの免疫組織化学

HRFを発現する子宮内膜細胞のタイプを、抗HRFポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学により決定した。その結果、HRFが子宮内膜腺と正常組織の間質細胞に共に存在することが同定されたが、宮内膜腺は間質細胞より強い発現を示した(図3Aおよび3B)。分泌と増殖フェーズの間における発現パターンの顕著な変化はなかった。さらに、子宮内膜症移植片におけるHRF発現も調査した。その結果、卵巣の子宮内膜症移植片の間質および上皮成分の両方にHRFが存在していた(図3Cと3E)。正常な子宮内膜の間質細胞でのHRF発現は弱いものに対して、卵巣の子宮内膜症移植片では子宮内膜腺と間質細胞はいずれも同様な高レベルのHRF発現を示した。これらのHRFに対する特異的なシグナルは、免疫前血清を対照として用いた場合には観察されなかった(データ示さず)。しかしながら、子宮内膜症移植片におけるHRF誘導のメカニズムは依然として不明である。M-CSFによる活性化段階においてマクロファージがHRFを誘導することを示す報告(Teshima S. et al. J. Immunol. 1998, 161(11):6353-66)と一致するように、子宮内膜症移植片においてはCD68陽性のマクロファージの関与が観察されている(Hornung D. et al. Am. J. Pathol. 2001, 158(6):1949-54)。従って、移植片の連続切片に対するCD68染色を利用して、HRF過剰発現領域内部におけるCD68陽性のマクロファージを同定した(図3F)。ヘマトキシリン-エオジンを用いて染色した対照切片は、子宮内膜症移植片の全体的な形態を示している。これらの結果から、子宮内膜症移植片におけるHRF産生にはマクロファージが寄与しているであろうと考えられる。

2-4. NIH3T3細胞の腹腔内移植に対するHRFの効果

HRF発現増加による生理学的な影響について調査した。子宮内膜症の原因は未だに不明である(Klincx R.P. et al. Gynecol Obstet Invest. 1999, 47 Suppl 1:3-9, discussion 9-10; van der Linden P.J.Q. Front Biosci. 1997, 2:c48-52)。主要な仮説に従うならば、子宮内膜症の発症は、卵管逆流により腹腔

に達した（逆行性月経）子宮内膜組織の移植および増殖による。ここではこの移植に対してHRFが及ぼす影響を調査した。最初に、HRFを過剰発現するNIH3T3細胞の安定形質移入体を作製した。HRF発現用のレトロウイルスベクター（pMSCV-HRF）を感染後に、高度なHRF発現が確認された（図4A）。次にこれらの細胞（pMSCV-HRF-3T3細胞）をヌードマウスの腹腔内に注射した。pMSCV-HRF-3T3細胞は、対照ベクター（pMSC-3T3）を感染させた細胞と比較して高い移植能を有していた（図4B）。これらのデータから、HRFは免疫学的機能不全においてのみならず、子宮内膜症移植片の初期発達にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

実施例 2

抗HRF抗体を含有する抗血清の調製し、この血清から抗HRF抗体を精製した。

【0058】

感作抗原としてヒトHRFタンパク質（配列番号2）のうちの101-116位のペプチドを選択して合成した。合成したペプチドはHLAをキャリアーとしてそれに結合させ、次にKLHと混合した（ペプチド50 μ gに対して50 μ gのKLH）。こうして得られた抗原液をフロイント完全アジュバントに混合し、感作抗原を有する溶液を調製した。この溶液を、体重3～4kgのウサギ（SPF Japanese White Rabbit）に対して2週間毎に1mlの量で皮下注射（5回）した。

【0059】

次に、5回目の皮下注射の後、1週間後に兎より採血し、血清を調製した。得られた血清に含まれる抗体がHRFタンパク質を特異的に認識することを確認し、これを抗HRF抗体を含む抗血清とした。

【0060】

ELISA法により抗血清が抗HRF抗体（HRF-GKL）であることを確認した。

【0061】

まず、20mM炭酸緩衝液（pH9.6）で希釈した抗原ポリペプチドでポリスチレン製96穴プレートのコートし（100ng/ウエル）、次に0.05% Tween20含有PBSを用いて洗浄して未吸着のペプチドを除去した。各ウエルに免疫兎より採血して得られた血清を添加し、室温で約1時間静置する。洗浄後、2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）標識抗ウサギ免疫グロブリンを加え、さらに室温で約1時間静

置する。洗浄後、基質である過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を加え発色させる。各ウェルに2N硫酸を加え発色反応を停止し、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機を用いて450nmの吸光度で測定する。比較として、免疫前に採血しておいた血清と比較して、確かに血清に含まれる抗体がHRFタンパク質を特異的に認識することを確認。上記操作は、組換えタンパク質抗原を使用して行うことも可能である。

【0062】

得られた抗HRF抗体を含む抗血清は、NIH3T3のtotal cell lysate 10 μ gを14%のSDS-PAGEにかけ、ウェスタンブロットにて2000倍に希釈した抗血清で検定してシングルバンドを与えることでその純度を確認している。この抗体は、マウスとヒト細胞で同じサイズの蛋白質を検出するものであった。

【0063】

精製抗HRF抗体の調製は、上記HRFタンパク質の101-116位のペプチドをアフィゲル(バイオラッド社製)に固定化したカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって実施できる。精製HRFペプチドをアフィゲル-10(バイオラッド社製)と混合し、4℃で1晩反応させた後、アフィゲルを20 mMリン酸緩衝液-生理食塩水(PBS)で十分に洗浄し、アフィゲルの未反応官能基は100 mMのモノエタノールアミンを含むPBS中で、1晩ブロッキングを行い、最終的にPBSで再度洗浄して、ペプチド固定化カラムを調製する。この固定化カラムに抗HRF抗体を含むウサギ血清を添加し、PBSで十分に洗浄した後、吸着した抗HRF抗体を20 mMグリシン-塩酸緩衝液(pH 4.0)で溶出する。溶出した抗HRF抗体溶液は直ちに200 mMトリス-塩酸緩衝液で中和し、PBSで1晩透析した後、-80℃で凍結保存する。

実施例 3

サンドイッチEIA

下記の方法に従えば、実施例2で調製した抗HRF抗体及び公知の抗HRF抗体から少なくとも1種を選択し、抗HRF抗体の2種の適当な組み合わせによってヒトHRFタンパク質を特異的に検出・測定するサンドイッチEIA系が構成できる。EIA系は1ステップ法、2ステップ法のいずれも可能であり、標識抗体はFab'-HRPに限定されない。各反応緩衝液の組成や反応条件は測定の目的に応じて、短縮、延長など

調整できる。また、標準品となるヒトHRFは、組織培養上清、細胞培養上清または実施例1記載あるいはそれ以外の方法で発現した組換え体から精製することができる。精製にはイオン交換、ゲルろ過、抗ヒトHRF抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーまたはそれ以外の各種アフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによって達成される。

(a) 標識抗体の調製

抗HRF抗体 (HRF-GKL) を0.1M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液、pH4.2に抗体量の2%(W/W)のペプシンを加え、37℃、24時間消化する。消化物に3M Tris-HCl、pH7.5を添加し、反応を停止する。0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムによるゲルろ過でF(ab')₂画分を分取する。このF(ab')₂画分に最終濃度0.01Mとなるようにシステアミン塩酸塩を添加し、37℃、1.5時間還元し、5mM EDTA含有0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムによるゲルろ過でFab'画分を分取する。

【0064】

上記の操作とは別にHRPを0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解、HRPの25倍モル量のEMCSをDMF溶液として加え、30℃、30分間反応させる。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0で平衡化したNICK-5カラム (Pharmacia)でゲルろ過しマレイミド標識HRP画分を分取する。

【0065】

Fab'画分とマレイミド標識HRPを等モルとなるように両画分を混合し、4℃、20時間反応させた後、Fab'の10倍モル量のN-エチルマレイミドで未反応のチオール基をブロックする。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムでゲルろ過し、Fab'-HRP標識抗体を分取する。これに0.1% BSAおよび0.001% クロルヘキシジンを添加して4℃で保存する。他の抗ヒトHRF抗体を用いても同様に処理できる。

(b) 抗体結合担体の調製

抗HRF抗体 (HRF-TPY) を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に溶解し、50 μg/mLの濃度に調製する。この抗体溶液を96穴マイクロプレートにウエルあたり100 μLずつ加え、4℃、18時間静置する。抗体溶液を除去し、生理食塩液で1回、0.05% Tween2

0、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄後、1% BSA、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0を加えブロッキングする。他の抗ヒトHRF抗体を用いても同様に処理でき、固相抗体を調製できる。

(c) 1ステップサンドイッチEIA法

精製したヒトHRF画分を標準抗原としてヒトHRF定量用標準曲線を作成する。1% BSA、0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で段階希釈した標準ヒトHRFを分注、それぞれに1% BSA、0.05% Tween 20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で調製した標識抗体Fab'-HRPを添加し十分混和する。調製した抗体結合マイクロプレートに0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄し、標準抗原と標識抗体混合液を添加する。室温で1時間反応した後0.05% Tween20、0.1M NaCl、5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄する。次に、6%ジメチルホルムアミド、0.005% 過酸化水素含有0.1 M酢酸緩衝液 (pH5.5)に溶解した0.01% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンをウェルに添加し、室温で20分間反応後、2N硫酸を添加し反応を停止する。この反応混液の450 nmをマイクロプレートリーダーを用いて測定し、標準曲線を求める。

【0066】

測定検体は、ヒトに由来する体液成分、各種ヒト組織の抽出液、ヒト由来あるいは組換え体など各種培養細胞の細胞抽出液、培養上清などから調製される。それぞれの測定検体は、標準ヒトHRFに代えて上記の1ステップサンドイッチEIAに供し、標準ヒトHRFと同時に反応を進行させる。測定検体から得られた吸光度を標準曲線にあてはめ、測定検体に含まれるヒトHRFの量を算出する。

【0067】

上記の他、市販の抗ヒトHRF抗体を使用し、瓜谷郁三他編、「生物化学実験法27、石川栄治著、酵素標識法」、株式会社学会出版センター(1991年6月20日発行)及び日本生化学会編、「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法」、p107-112、東京化学同人、1986年3月14日発行に記載の方法(これら文献において引用されている文献に記載の方法も含む)に従って、酵素標識抗体を調製でき、さらにそれを測定に使用できる。

実施例 4

ウエスタンブロッティング

ヒトHRFを発現する細胞又は組織の培養上清及び精製組換えヒトHRFを還元条件下、10-15% SDS-PAGEで分離後、polyvinylidene difluoride(PVDF)膜 (MILLIPORE)に転写した。続いて5% BSA又は5%スキムミルクおよび0.05%アジ化ナトリウム含有TBS (ブロッキングバッファー) を用いて室温で0.5-1時間ブロッキングした後、HRF-GKLで処理し、25℃で6時間以下の時間インキュベートする。それぞれの膜を0.1% Tween 20含有TBS(0.05%アジ化ナトリウム含有)で4回洗浄し、結合した抗体をブロッキングバッファーで1:1,000に希釈したHRP結合抗ウサギイムノグロブリン抗体と25℃、1時間反応させる。反応後、膜を0.1% Tween 20含有TBS(0.05%アジ化ナトリウム含有)で4回洗浄し、結合した抗体をEnhanced chemiluminescence(ECL, Amersham Pharmacia)により検出する。

【0068】

上記の他、HRF-TPYを使用し、口野嘉幸他編、「遺伝子・タンパク質、実験操作 ブロッティング法」、p212-241、株式会社ソフトサイエンス社、昭和62年11月10日発行に記載の方法（これら文献において引用されている文献に記載の方法も含む）に従って、ウエスタンブロッティングを実施できる。

【0069】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、子宮内膜症関連疾患およびそのリスクを簡便かつ確実に診断する方法と、そのための材料が提供される。これによって、子宮内膜症関連疾患の早期の発見、より適切な治療法の選択、再発の防止等が可能となる。

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Diagnosis method of endometriosis

<130> NP02478-YS

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 830

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (95)..(613)

<223>

<400> 1

ccccccgag cgccgctccg gctgcaccgc gctcgctccg agtttcaggc tcgtgctaag 60

ctagcgccgt cgctgtctcc cttcagtcgc catc atg att atc tac cgg gac ctc 115

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu

1

5

atc agc cac gat gag atg ttc tcc gac atc tac aag atc cgg gag atc 163

Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile

10

15

20

gcg gac ggg ttg tgc ctg gag gtg gag ggg aag atg gtc agt agg aca 211
 Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu Gly Lys Met Val Ser Arg Thr
 25 30 35

gaa ggt aac att gat gac tcg ctc att ggt gga aat gcc tcc gct gaa 259
 Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu
 40 45 50 55

ggc ccc gag ggc gaa ggt acc gaa agc aca gta atc act ggt gtc gat 307
 Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser Thr Val Ile Thr Gly Val Asp
 60 65 70

att gtc atg aac cat cac ctg cag gaa aca agt ttc aca aaa gaa gcc 355
 Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala
 75 80 85

tac aag aag tac atc aaa gat tac atg aaa tca atc aaa ggg aaa ctt 403
 Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu
 90 95 100

gaa gaa cag aga cca gaa aga gta aaa cct ttt atg aca ggg gct gca 451
 Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala
 105 110 115

gaa caa atc aag cac atc ctt gct aat ttc aaa aac tac cag ttc ttt 499
 Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe
 120 125 130 135

att ggt gaa aac atg aat cca gat ggc atg gtt gct cta ttg gac tac 547

Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr

140

145

150

cgt gag gat ggt gtg acc cca tat atg att ttc ttt aag gat ggt tta 595

Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu

155

160

165

gaa atg gaa aaa tgt taa caaatgtggc aattatittg gatctatcac 643

Glu Met Glu Lys Cys

170

ctgtcatcat aactggcttc tgcttgcac ccacacaaca ccaggactta agacaaatgg 703

gactgatgtc atcttgagct cttcatttat ttgactgtg atttatitgg agtggaggca 763

ttgttttttaa gaaaaacatg tcatgtaggt tgtctaaaaa taaaatgcat ttaaactcat 823

ttgagag 830

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> Homo. sapiens

<400> 2

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp

1

5

10

15

Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu
20 25 30
Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile
35 40 45
Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser
50 55 60
Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu
65 70 75 80
Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met
85 90 95
Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys
100 105 110
Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
115 120 125
Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
130 135 140
Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met
145 150 155 160
Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
165 170

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

ccacaaccac caagaactgc ttag

24

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

gaaggggacg aaggaagagt g

21

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

gggaaatcgt gcgtgacgtt aag

23

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

tgtgttggcg tacaggtctt tg

22

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ttggatccat gatcatctac cgggacctg

29

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 8

ttgaattctt aacatttctc catctctaa

29

【図面の簡単な説明】

【図 1】

正常子宮内膜組織、子宮内膜症患者に由来する正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片におけるHRFとCYP1A1の発現を調べた結果である。(A)HRF mRNAレベルはノーザンブロット分析により調べた。プロットの再プローブをヒト β アクチンプローブを用いて行い、トータルRNAレベルを決定した。ノーザンブロットにより調べた試料中のCYP1A1 mRNAレベルはサザンブロット分析を用いた定量的RT-PCRにより決定した。定量の精度を確認するため、5倍の異なる濃度のcDNA試料(1xおよび5x)をPCRテンプレートとして用い、同様な配置で調べた。 β アクチンをmRNA量に対する内部対照として用いた。(B)HRFおよびCYP1A1のmRNAレベルに対する画像表示を同様に示す。mRNAレベルはdensitometry (MOLECULAR IMAGE R, Nippon Bio-Rad)を用いて β アクチンシグナルに対して正規化した。試料11-2AはHRFのmRNAレベル、10-2AはCYP1A1のmRNAレベルを示し、任意に10に設定した。複数の試料が一個人由来である場合には、平均値を計算して表示した。エラーバーは複数試料の最大値を表す。12-1、7-1、8-1および6Bは正常な子宮内膜組織であり、アステリスクが印字された1Cは子宮内膜症患者の正所性子宮内膜である。

【図 2】

子宮内膜症移植片におけるHRF発現を調べた結果である。(A)正常な子宮内膜組織、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片におけるHR

F発現のノーザンブロット分析の結果である。プロットはヒト β アクチンプローブを用いて再プローブを行い、トータルRNAレベルを決定した。カラム上のN、EuおよびEnはそれぞれ正常な子宮内膜組織、子宮内膜症患者の正所性子宮内膜組織、および子宮内膜症移植片を示す。(B)図1Aおよび図2Aにおいて調査した試料について、ノーザンブロット分析により測定したHRF mRNAレベルのグラフ表示である。HRF mRNAレベルはdensitometry (MOLECULAR IMAGER, Nippon Bio-Rad) を用いて β アクチンシグナルに対して正規化した。試料6BのmRNAレベルを任意に1に設定した。複数の試料が一個人由来である場合には、平均値を計算して表示した。エラーバーは複数試料の最大値を表す。

【図 3】

HRFおよびCD68発現の免疫組織化学的分析の結果である。茶色の染色で陽性部分が可視化されている。逆染色にはヘマトキシリンを用いた。(A)および(B)正常な子宮内膜組織におけるHRFタンパク質の検出 (A:増殖フェーズ、B:分泌フェーズ、原図倍率 $\times 200$)。(C)卵巣の子宮内膜症移植片内部におけるHRFタンパク質の検出 (原図倍率 $\times 200$)。(D)子宮内膜症移植片の形態を示す連続切片のH&E染色 (原図倍率 $\times 200$)。(E)さらに高倍率で(C)と同じ視野のHRFタンパク質を検出したもの (原図倍率 $\times 400$)。(F)子宮内膜症移植片の連続切片におけるCD68陽性マクロファージの免疫組織化学的局在 (原図倍率 $\times 400$)。

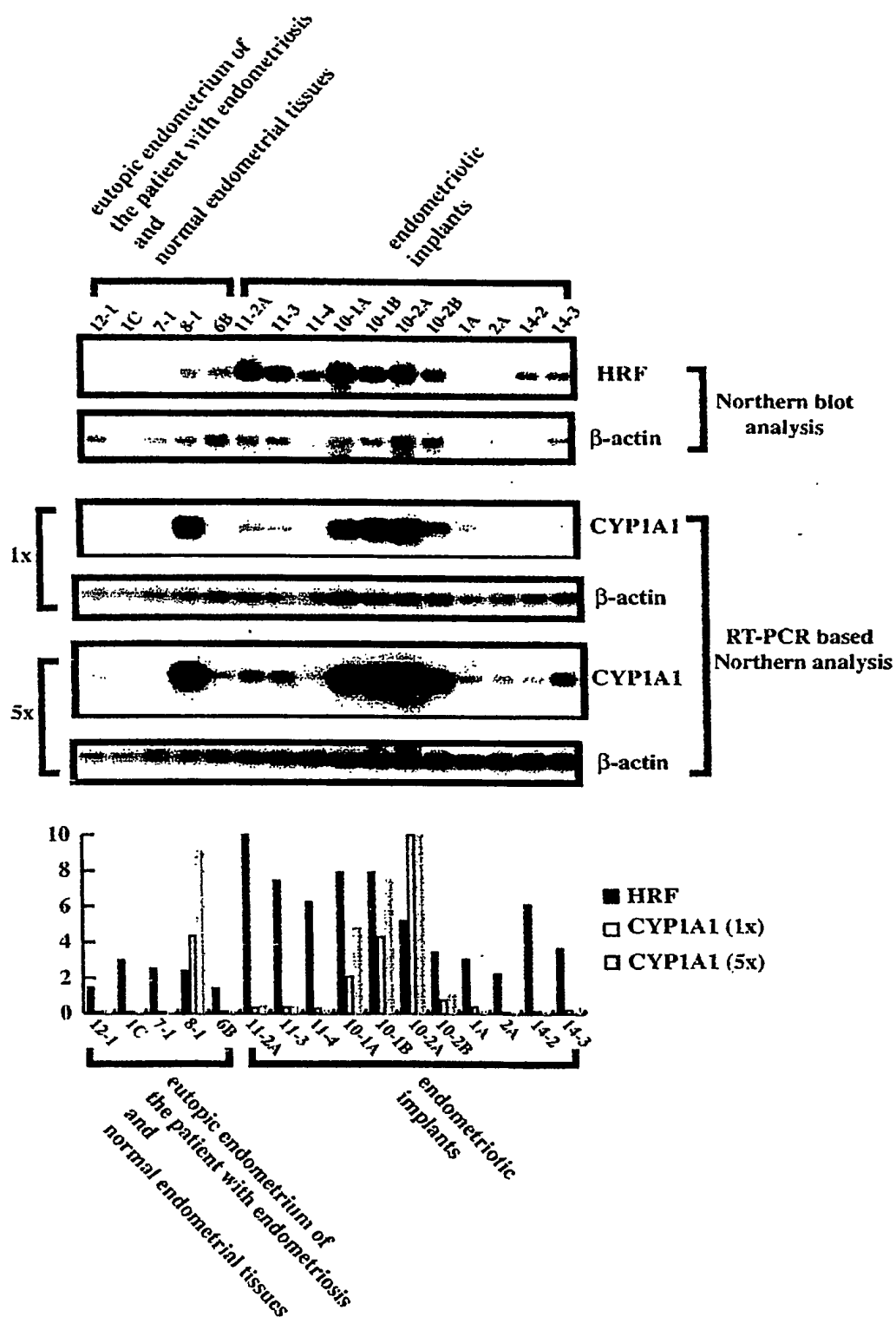
【図 4】

移植アッセイの結果である。(A)NIH3T3細胞内のHRFタンパク質のウエスタンブロット分析の結果。wt:親のNIH3T3細胞、HRF:HRFを含むレトロウイルスベクターによる感染後に安定してHRFを発現する細胞株 (pMSCV-HRF-3T3)、vector:空のベクターを感染させた対照細胞 (pMSCV-3T3)。(B)ヌードマウスにおけるHRF過剰発現細胞の示す高い移植効率を示す。縦軸上のマークは次の状態を示す。+++:無数の移植コロニーが観察された状態、++:数十個の移植コロニーが観察された状態、+:数個の移植コロニーが観察された状態、-:移植コロニーは観察されなかった状態。対照細胞またはHRF過剰発現細胞を注射した個々のマウスは、それぞれ白丸または黒丸により示す。

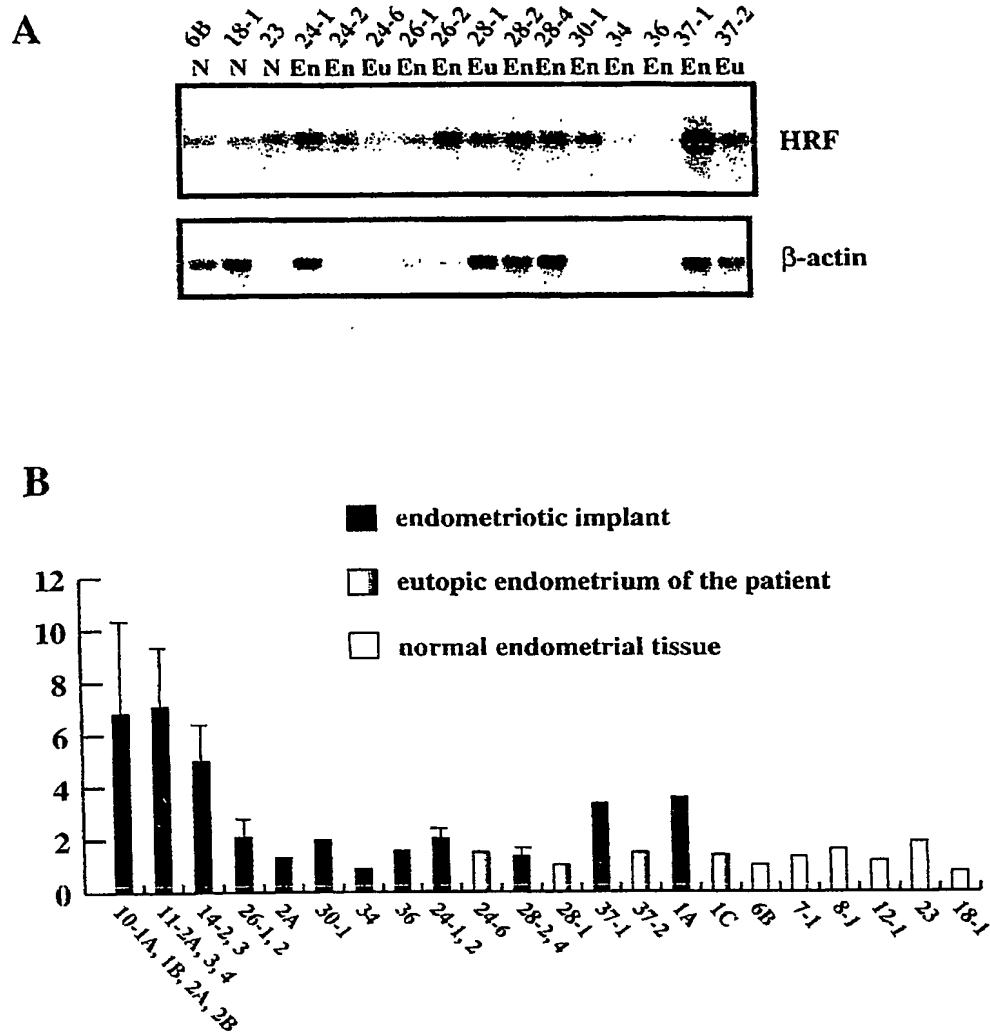
【書類名】

図面

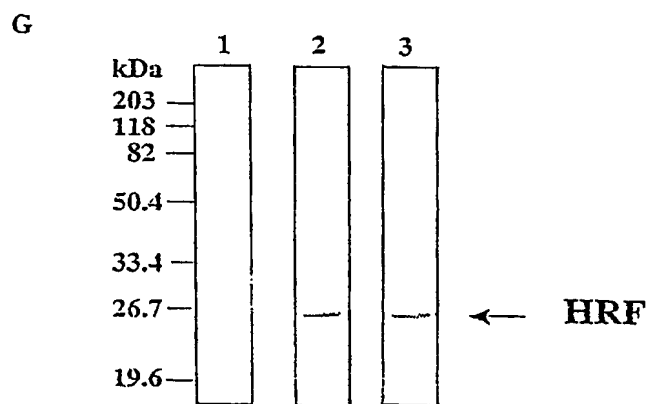
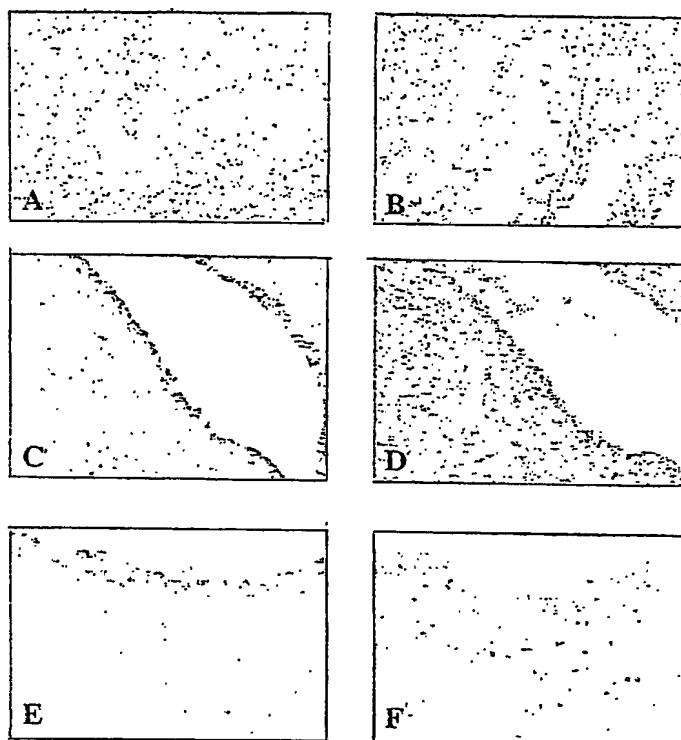
【図1】



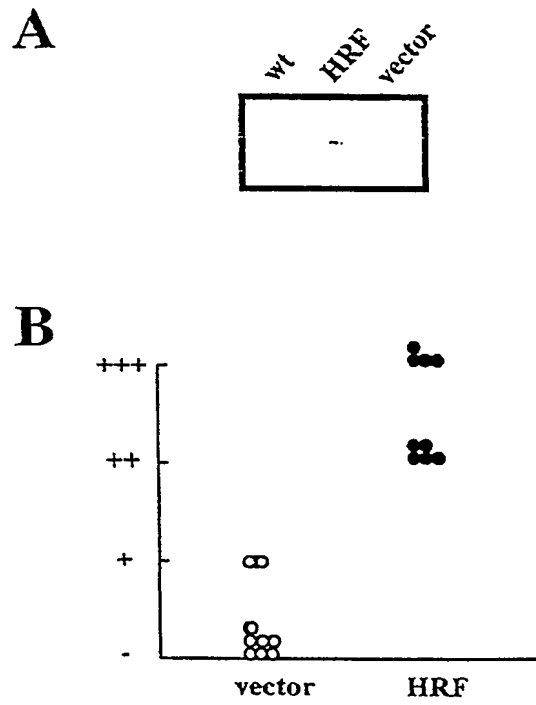
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 子宮内膜症関連疾患を簡便かつ確実に診断する方法を提供する。

【解決手段】 被験者の生体試料におけるヒスタミン放出因子（HRF）タンパク質の存在量を測定し、HRFタンパク質量を正常生体試料のそれと比較し、正常生体試料と比較して有意に高いHRFタンパク質量を、子宮内膜症関連疾患またはそのリスクの程度の指標とする。

【選択図】 なし

特願 2003-196459

出願人履歴情報

識別番号 [503028352]

1. 変更年月日 2003年 1月20日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都杉並区浜田山4-27-4 ウエストコート205号
氏 名 黒田 雅彦
2. 変更年月日 2003年 8月15日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都杉並区南荻窪1-7-11
氏 名 黒田 雅彦

特願 2 0 0 3 - 1 9 6 4 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 2 5 2 8 0 9]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 7 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区羽根木 1 - 3 - 2

氏 名

小杉 好紀